

10/1356 72/1111

2 EP 2004/
PCT/JP 02/12392

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

27.11.02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月27日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-089622

[ST.10/C]:

[JP2002-089622]

出 願 人

Applicant(s):

筑波大学長

REC'D 31 JAN 2003

WIPO

PCT

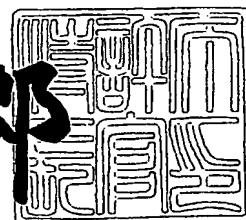
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 1月14日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2002-3105723

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01-0960

【提出日】 平成14年 3月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/09
A01H 1/00
A01N 63/00
C07K 14/415

【発明の名称】 新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子とその利用

【請求項の数】 8

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市大砂字大久保 2 4 7 - 4 6

 【氏名】 渡邊 和男

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市大砂字大久保 2 4 7 - 4 6

 【氏名】 渡邊 純子

【特許出願人】

 【識別番号】 391012361

 【氏名又は名称】 筑波大学長

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【代理人】

 【識別番号】 100118773

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 藤田 節

【代理人】

 【識別番号】 100119183

【弁理士】

【氏名又は名称】 松任谷 優子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子とその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) 又は (b) の DNA からなる遺伝子。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA。

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ宿主にネコブセンチュウ抵抗性を付与する DNA。

【請求項 2】 前記ネコブセンチュウ抵抗性が、遺伝子のコピー数に応じて抵抗性が増す量的抵抗性であることを特徴とする、請求項 1 記載の遺伝子。

【請求項 3】 請求項 1 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

【請求項 4】 請求項 1 記載の遺伝子を導入して得られる形質転換体。

【請求項 5】 宿主が植物である、請求項 4 記載の形質転換体。

【請求項 6】 前記植物がナス科植物である、請求項 5 記載の形質転換体。

【請求項 7】 請求項 1 記載の遺伝子を導入することにより、ネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物を作製する方法。

【請求項 8】 請求項 1 記載の遺伝子を含む、ネコブセンチュウ防除薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子に関する。より詳細には、高温感受性がなく、幅広い種や系統のネコブセンチュウに対応可能な、量的抵抗性を有する新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子と、該遺伝子の利用方法に関する。

【0002】

【従来技術】

センチュウは大きな門を構成する動物体で、植物や動物に寄生する 1 種の害虫である。植物に寄生するネコブセンチュウは、一般に体長 1 mm 以下であるが、植物細胞の原形質から栄養をとり、その被害は全世界で年間約 10 億ドルにも達する。ネコブセンチュウのうち、メロイドジーネ (Meloidogyne) 属に属するもの (

英名ルート・ノット・ネマトード: root knot nematode) は、現在約70種が確認されている。これらは、全ての作物及び多くの雑草に寄生するため、2000種を超える植物種に影響を与えると報告されており、その中にはサツマイモやトマト、ジャカイモも含まれる。

【0003】

ネコブセンチュウに感染しても、地上部分では、感染初期に寄生の判別に有効なはっきりとした兆候は見られないが、地下ではコブ (gall 或いは knot) が形成され始める。このコブの大きさは種や品種により異なり、多くの場合1-2mm程度であるため、肉眼では確認しにくい場合もあるが、コブの表面や根に産卵される卵の固まりは肉眼でも確認できる。最も顕著な兆候は、根や塊茎にあらわれる縦状の亀裂で、感染した根や塊茎中には様々な発達段階のセンチュウが寄生する。ネコブセンチュウの感染は収量を減少させるだけではなく、寄生した根や塊茎の市場価値を激減或いは喪失させる。また、根や塊茎の亀裂は、別の病原生物の攻撃を容易にし、複合感染の可能性を増大させる (Hooker, W.J., Compendium of Potato Diseases, pp11-12, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA; Jansson & Raman, Sweet Potato Pest Management, pp1-12, 1991, Westview Press, Boulder, Colorado, USA; Jones et al. Compendium of Tomato Diseases, pp49-50, 1991, APS PRESS, St. Paul, Minnesota, USA)。

【0004】

ジャガイモに寄生するメロイドジネ属のセンチュウは、メロイドジネ アレナリア チトウッド (*Meloidogyne arenaria* Chitwood)、メロイドジネ インコグニータ チトウッド (*M. incognita* Chitwood)、メロイドジネ ハブラ チトウッド (*M. hapla* Chitwood)、メロイドジネ ジャバニカ チトウッド (*M. javanica* Chitwood) の4種である。このうち、メロイドジネ・インコグニータは、世界中のジャガイモ圃場において、最も頻繁に発生するセンチュウである (Hooker, W.J., Compendium of Potato Diseases, pp97-98, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA)。日本でも、暖かい九州のジャガイモ栽培地域で発症がみられ、作物の抵抗性付与や総合防除法の開

発が望まれている。

【0005】

ジャガイモにおけるネコブセンチュウの制御としては、古くから輪作による方法が行なわれてきた。この方法は、センチュウの集団密度を低下させるという点では有効な方法であるが、雑食性のネコブセンチュウでは輪作のサイクルに限界があるため、輪作のみでネコブセンチュウを制御することは難しい。一方、有機肥料を加えて、アンモニア系窒素の働きでネコブセンチュウの集団密度を押さえることもできる。この方法は、現在もアフリカ、アジア、中南米で実施されているが、ネコブセンチュウに対する決定的な防御法ではない。他方、速攻性という点では、ジクロロプロペン (dichloropropene) や臭化メチル (methylbromide) 等による土壌燻蒸が最も優れているが、生態系あるいは作業員への悪影響という問題がある。

【0006】

昨今、ホストであるジャガイモ自身のセンチュウ抵抗性を高める方法が試みられ、種々の抵抗性を有する育種系統が作出されている (Watanabe et al. Amer. Potato J. 71: 599-604, 1994; Watanabe et al. Breeding Science 45: 341-347, 1995; Watanabe et al. Breeding Science 46: 329-336, 1996; Watanabe et al. Breeding Science 49: 53-61, 1999; Watanabe & Watanabe Plant Biotechnology 17: 1-16, 2000)。しかし、センチュウのうち、メロイドジネ・インコグニータに対して高い抵抗性を持つジャガイモは、未だ作出されていない。

【0007】

ところで、ネコブセンチュウ抵抗性を有する2倍性野生近縁種から栽培ジャガイモへの抵抗性付与も試みられている。2倍性野生近縁種には、ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子 (Rmi) が存在し、この遺伝子は相加的効果のある量的抵抗性を有することが、表現型の遺伝解析や育種経験からわかっている (Iwanaga et al., J. Amer. J. Hort Sci., 114(6): 1008-1113 (1989); Watanabe et al. Breeding Sci., 46: 323-369 (1996); Watanabe et al., Breeding Sci., 49: 53-61 (1999))。また、上記文献には、このRmi遺伝子によって誘導される抵抗性は、温度に対する感受性がなく高温でも有効であることも報告されている。

しかしながら、このRmiはいまだ単離されておらず、その配列もわかっていない。また、栽培ジャガイモは同質4倍体であるため遺伝様式が複雑で、有用な抵抗性品種の育種は実現していない。

【0008】

ネコブセンチュウ属に対する抵抗性遺伝子群は、現在のところトマト及びジャガイモにおいてのみ、いくつかの遺伝地図上の位置が確認されている。例えば、トマトにおいては、メロイドジーン インコグニータ チトウッド、メロイドジーン ジャバニカ チトウッド、及びメロイドジーン アレナリア チトウッドに対する*Licopersicon. peruvianum*由来抵抗性遺伝子Miが、染色体6番上 (Messeguer et al., Theor. Appl. Genet., 82: 529-536, 1991; Ho et al., Plant J., 2: 971-982, 1992) に座上がることが報告されている。また、メロイドジーン インコグニータ チトウッド及びメロイドジーン ジャバニカ チトウッドに対する*L. peruvianum*由来抵抗性遺伝子Mi3が染色体12番上 (Yaghoobi et al., Theor. Appl. Genet., 91: 457-464, 1995) に座上がることが報告されている。Mi遺伝子、Williamsonらのグループにより単離され、その構造も明らかにされている (Gressan et al., Proc Natl Acad. Sci, 95: 9750-9754, 1998; Milligan et al., Plant Cell, 10: 1307-1319, 1998)。しかし、Mi遺伝子は高温感受性であるため、感染初期の24～48時間に高温露出されると、抵抗性が機能しなくなるという問題がある。

【0009】

ジャガイモについては、メロイドジーン チトウデいの、レース1に対するRmc1遺伝子座が*S. bulbocastanum* (ソラナムバルボカスタナム) の染色体11番に座上がることが報告されている (Brown et al., Theor Appl. Genet., 92: 572-576, 1996)。また、メロイドジーン・インコグニータ・チトウッドに対する抵抗性の伝達について、1) 二つ以上の遺伝子が抵抗性に関与している可能性 (Gomez et al., Amer. Potato J., 60: 353-360, 1983)、及び2) 細胞質が抵抗性の発現に関与している可能性 (Gomez et al., Amer. Potato J., 60: 353-360, 1983, Iwanaga et al., J. Amer. Hort. Sci., 114: 1108-1013, 1989,)が指摘されている。さらに、メロイドジーン インコグニータ チトウッドに対する抵

抗性は5-6の抵抗性遺伝子に支配される相加的な量的抵抗性であることがわかってきている(Watanabe et al., Breed. Sci., 9: 53-61, 1999; Watanabe et al. submitted)。

【0010】

一般に、植物の病原体 (pathogen) に対する強度の抵抗性は、非常に特異性 (specificity) が高い場合が多い。フローが提唱した遺伝子対遺伝子説 (gene for gene hypothesis) (Flow, Ann Rev. Phytopathol., 9: 275-296, 1971) は、このような高い特異的抵抗性を、植物の抵抗性遺伝子 (resistance gene) と病原体の非病原性遺伝子 (avirulence gene) の相互作用から説明する。そして、遺伝子対遺伝子の分子認識機構としては、リガンド レセプターモデルが一般に仮定されている (Gabriel & Rolfe, Ann. Rev. Phytopathol. 28: 365-391, 1990)。

【0011】

単離された抵抗性遺伝子は、現在までに遺伝子産物の機能や構造の類似点から、5つのグループに整理されている (Baker et al., Science, 276: 726, 1997; Bergelson et al. Science 292: 2281-2285, 2001; Dangl and Jones, Nature 411: 826-833, 2001)。このうち、クラスIに分類される抵抗性遺伝子は、ヌクレオチド結合領域 (Nucleotide binding site: NBS) 及びロイシン反復領域 (leucine rich repeat: LRR) を有し、これらの領域が抵抗性発現のシグナル伝達に参与していることが予想されている。クラスIに属する単離された遺伝子には、タバコのtabacco mosaic virusに対するN (Whitham et al., Cell, 78: 1101-1105, 1994)、アマのMelampsora lininに対するL6 (Lawrence et al., Plant Cell, 7: 1195-1206, 1995) 及びM (Anderson et al., Plant Cell, 9: 641-651, 1997)、シロイヌナズナのPersonospora parasiticaに対するRPP5 (Bent, Plant Cell, 8: 1757-1771, 1996)、Pseudomonas syringaeに対するRPS2 (Bent et al., Science 265: 1856-1860, 1993; Mindrinos et al., Cell, 78: 1089-1099, 1994) 及び、RPM1 (Grant et al., Science, 269: 843-846, 1995)、トマトのPseudomonas syringaeに対するPRF (Salmeron et al., Cell, 86: 123-133, 1996) 及び、Fusarium oxysporumに対するI2C-1 (Ori et al., Plant Cell, 9: 521-

531, 1997)等が含まれる。さらに、前述のトマトにおける*L. peruvianum*由来のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子Miも、NBS及びLRRを有する遺伝子であることが明らかにされている (Milligan et al., *Plant Cell*, 10: 1307-1319, 1998)。

【0012】

クラスIに属するタンパク質は、C末端側に不完全なLRRをもち、N末端側にNBSをもっている。NBSはATPase及びGTPase等に見られるタイプで、Pループを含む3つのモチーフから構成されている (Traut, *Eur J. Biochem.*, 229: 9-19, 1994)。一般に、最初のキナーゼ1aドメインは、リン酸結合ループを形成し、その下流にはキナーゼ2ドメインが存在する。このキナーゼ2ドメイン中の固定したアスパラギン酸は、リン酸の移行反応に必要な金属結合部位を調整していると予想されている。さらに下流に位置するキナーゼ3aドメインは、ATPのプリンとしばしば相互作用するチロシン又はアルギニンを有する (Traut, *Eur J. Biochem.*, 229: 9-19, 1994)。これらのNBSの存在は、抵抗性機能にキナーゼ活性或いはGタンパク質が重要な役割を有することを示唆している (Hammond-Kosack & Jones, 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 575-607, 1997)。

【0013】

一方、LRRドメインは様々なタンパク質に見られ、イースト、ショウジョウバエ、ヒト等の種においては、多くの場合タンパク質-タンパク質相互作用に関わるものと考えられている (Kobe & Deisenhofer, *Nature*, 366: 751-756, 1993)。しかし、植物病害虫抵抗性においては、LRRドメインは、非病原性 (Avr) 遺伝子により産出されたりリガンド結合ドメインとして機能したり、抵抗性 (R) 遺伝子の産物と、防御シグナル伝達に関係する他のタンパク質との相互作用を容易にするものではないかと推測されている (Bent, *Plant Cell*, 8: 1757-1771, 1996)。

【0014】

ところで、ジャガイモは世界の主要作物であり、アメリカ合衆国や日本等の先進国における多投資型 (high input) から、アフリカ、アジア、ラテンアメリカの発展途上国における低投資型 (low input) 農業までの幅広い生産体制に対応する優れた作物である。主食や野菜、スナックとしての食用のみでなく、飼料や

工業用澱粉及び醗酵材料としても世界中で広く栽培されている (Harris, P.M. The Potato Crop, Chapman and Hall, London, 1978; International Potato Center <http://www.cgiar.org.cip/> 2001)。特に発展途上国においては、生産量及び熱量供給の両面から、最も重要な作物の一つである。爆発的な人口の増大が進行するこれらの国々において、貴重な食糧源として、今後ますますジャガイモの生産量及び生産性の向上が期待されている。

【0015】

一方、ジャガイモの生産量の多くは病害虫により失われ、その中でもネコブセンチュウによる被害は、熱帯、亜熱帯から温帯に渡る広い地域に及ぶ深刻なものである (Hooker, W.J., Compendium of Potato Diseases, p97-98, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA)。

【0016】

しかしながら、ネコブセンチュウによる被害に対する決定的な解決策はなく、抵抗性遺伝子の機能や構造についての解明が待ち望まれていた。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、様々なネコブセンチュウに幅広く対応できる、優れたネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を見出し、深刻なネコブセンチュウ被害に対する解決策を提供することを課題とする。

【0018】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、2倍性ジャガイモ系統を対象として、植物抵抗性遺伝子群に共通なNBSやLRRなどの配列情報を基に探索を行った結果、従来にない優れたネコブセンチュウ抵抗性を有する新規遺伝子の単離に成功した。そして、該遺伝子を利用することにより、優れたネコブセンチュウ抵抗性組換え植物の作出に成功し、本発明を完成するに至った。

【0019】

すなわち、本発明は、以下の(1)～(8)に関する。

(1) 以下の(a)又は(b)のDNAからなる遺伝子。

- (a) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNA。
- (b) 配列番号1で表される塩基配列からなるDNAと相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ宿主にネコブセンチュウ抵抗性を付与するDNA。
- (2) 前記ネコブセンチュウ抵抗性が、遺伝子のコピー数に応じて抵抗性が増す量的抵抗性であることを特徴とする、上記(1)記載の遺伝子。
- (3) 上記(1)記載の遺伝子を含有する組換えベクター。
- (4) 上記(1)記載の遺伝子を導入して得られる形質転換体。
- (5) 宿主が植物である、上記(4)記載の形質転換体。
- (6) 前記植物がナス科植物である、上記(5)記載の形質転換体。
- (7) 上記(1)記載の遺伝子を植物に導入することにより、ネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物を作製する方法。
- (8) 上記(1)記載の遺伝子を含む、ネコブセンチュウ防除薬剤。

【0020】

【発明の実施の形態】

1. 新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子

(1) 本発明の遺伝子の特徴

本発明の遺伝子は、2倍性ジャガイモ系統より単離された、新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子である。該遺伝子は、従来知られているネコブセンチュウ抵抗性遺伝子とは異なり、以下のような特徴を有する。

- ① トマトの抵抗性遺伝子(Mi遺伝子)のような優性ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子(single dominant)とは異なり、遺伝子のコピー数に応じて抵抗性が増す「量的抵抗性」を持つ。
- ② トマトの抵抗性遺伝子のような高温感受性による抵抗性のブレークダウンがない。
- ③ 様々なネコブセンチュウの種や系統に幅広く対応できる。

【0021】

(2) 本発明の遺伝子の単離

本発明の遺伝子は、ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を有することが知られてい

る 2 倍性ジャガイモ系統85.37.38 (Watanabe et al. Amer. Potato J. 71: 599-604, 1994) のゲノムDNAまたはcDNAライブラリーから、植物抵抗性遺伝子群に共通なNBSやLRRなどの配列情報を基に検索することができる。例えば、Hammond-Kosack and Jones (1997 Ann. Rev. Plant Physiol. Plan Mol. Biol. 48: 575-607) などの総論を参考に、既知の植物病虫害抵抗性遺伝子に保存的な領域、例えばNBSやLRRの配列に基づき、プライマーを設計する。そして、該プライマーを用いて、前記 2 倍性ジャガイモ系統のcDNAライブラリーから、目的とする遺伝子を増幅、単離すればよい。

【 0 0 2 2 】

(3) 塩基配列の決定

得られた遺伝子は、常法にしたがい塩基配列の決定をすることができる。塩基配列の決定は、マキシム-ギルバートの化学修飾法、M13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法、又は自動塩基配列解析装置 (PERKIN-ELMER社製 : ABI PRISM 377 DNA Sequence System 等) を用いた方法等、公知の方法を利用すればよい。

【 0 0 2 3 】

配列番号1は、こうして特定された、本発明のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子の塩基配列を示す。しかし、本発明にかかるネコブセンチュウ抵抗性遺伝子は、上記配列に限定されず、配列番号1に示される塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件下でハイブリダイズできる遺伝子も、(1)に記載した本発明の遺伝子に特徴的なネコブセンチュウ抵抗性を宿主に付与することができる限り、本発明の遺伝子に含まれるものとする。なお、ストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が10mM~300mM、温度が25℃~70℃、好ましくはナトリウム濃度が50mM~100mM、温度が42℃~55℃の条件をいう。

【 0 0 2 4 】

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又は本遺伝子のcDNAもしくはゲノムDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは核塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、さらに本発明の遺伝子を得ることができる。

【 0 0 2 5 】

2. ベクター

本発明は、本発明の遺伝子を含む組換えベクターを提供する。該ベクターは、本発明の遺伝子をそのまま、又は適当な制限酵素で消化し、あるいは、適当なリンカーを連結して、プラスミド等の適当なベクターに導入することにより作製される。該ベクターとしては、pUC18、pUC19、pUC118、pUC119等のpUC系ベクター、pBI101、pBI121、pGA482等のバイナリーベクターを挙げることができる。特に、アグロバクテリウムのバイナリーベクターを用いる場合は、該バイナリーベクターの境界配列間に外来遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌内で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404、EHA101、EHA105、C58C1Rif^R等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、これを形質転換体用ベクターとして用いる。

【 0 0 2 6 】

宿主内で外来遺伝子を発現させるためには、該遺伝子の前後に、それぞれプロモーターとターミネーターを配列させる必要がある。前記プロモーターとターミネーターは特に限定されず、宿主内で機能することが知られている任意のものを用いることができる。植物を宿主とする場合であれば、例えば、プロモーター配列としては、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S 転写物 [The EMBO J. 6:3901-3907 (1987)、トウモロコシのユビキチン [Plant Mol. Biol. 18: 675-689 (1992)]、ノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子、オクトピン (OCT) 合成遺伝子のプロモーターが挙げられる。またターミネーター配列としては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター等が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

さらに効率的に目的の形質転換体を選抜するために、有効な選択マーカー遺伝子を導入することが好ましい。該選択マーカーとしては、カナマイシン耐性を付与する遺伝子、抗生物質ハイグロマイシンに対する抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (hpt) 遺伝子及びピアラフォスに対する抵抗性を植物に付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (ba

r) 遺伝子等を挙げることができる。こうした選択マーカー遺伝子と本発明の遺伝子は、単一のベクターと一緒に組み込んでも良いし、それぞれを別個のベクターに組み込んだ2種類の組換えDNAを用いてもよい。

【0028】

3. 形質転換体

本発明はまた、本発明の遺伝子を導入した形質転換体を提供する。該形質転換体は、前述の本発明のベクターを用いて、宿主を形質転換することにより作製される。該宿主は、本発明の遺伝子が機能しうるものであれば特に限定されないが、植物であることが好ましく、例えば、ナス科植物、サツマイモ等のヒルガオ科植物、大根等の根菜類を含むアブラナ科植物等、2000種以上の植物において有効に機能しうると考えられる。なかでも、ジャガイモ、タバコ、トマト等のナス科植物が好適である。なお、本発明において「植物」という言葉には、植物培養細胞、栽培植物個体、植物器官（例えば葉、花卉、茎、根、根茎、種子等）、又は植物組織（例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等）のすべてを含むものと見なされる。例えば、植物培養細胞、植物体、植物器官、又は植物組織を宿主とする場合、採取した植物切片に本発明の遺伝子を、アグロバクテリウムのバイナリーベクター法、パーティクルガン法、又はポリエチレングリコール法等を用いて導入することにより、目的とする形質転換体を得ることができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法で遺伝子を導入して形質転換体を作製してもよい。

【0029】

本発明の遺伝子が導入された形質転換体は、選択マーカーによるスクリーニング、又はネコブセンチュウ抵抗性という本発明の遺伝子が有する機能発現解析により、選抜することができる。得られた形質転換体、特に組換え植物は、土壌又はバーミキュライトを詰めたポットで栽培し、株分けすることによって増殖させることが可能である。こうして増殖させた組換え植物、及びその子孫もすべて、本発明の遺伝子を有する限り、本発明の形質転換体の範囲に含まれる。

【0030】

4. ネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物

本発明のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を導入された組換え植物は、幅広い種のネコブセンチュウに対して強い抵抗性を有する。しかも、本発明の遺伝子によって付与される抵抗性は、遺伝子導入数に応じて抵抗性が増す「量的抵抗性」である。ちなみに、従来知られているネコブセンチュウ抵抗性遺伝子は量的抵抗性を持たない。したがって、導入する遺伝子数を増加させることにより、本発明の遺伝子はより強力なネコブセンチュウ抵抗性組換え植物を作出することができる。

【0031】

一方、これまで同定されているネコブセンチュウ抵抗性遺伝子は温度感受性であり、一定の温度以上に達すると抵抗性を失ってしまうものであった（Miは通常28℃で失活する）。しかし、本発明の組換え植物は、33～35℃という高い温度条件下で栽培してもネコブセンチュウに対する抵抗性維持することができる。したがって、本発明の遺伝子を導入した組換え植物は、温帯や熱帯など比較的気温が高い地域においても、ネコブセンチュウ抵抗性を維持し続ける組換え植物を作出することができる。

かくして、本発明は、従来にないネコブセンチュウ抵抗性を有する組換え植物とその作製方法を提供することができる。

【0032】

5. その他

本発明の遺伝子は、宿主、特にジャガイモ、タバコ、トマト等のナス科植物に優れたネコブセンチュウ抵抗性を付与する。したがって、該遺伝子や該遺伝子を含む組成物は、ネコブセンチュウ防除薬剤として使用しうる。本発明の遺伝子や、該遺伝子を導入された組換え植物、該遺伝子を含むネコブセンチュウ防除薬剤は、ネコブセンチュウの被害が深刻な地域において、その被害を抑え、作物の生産性を向上させる重要な効果を有する。

【0033】

【実施例】

以下、実施例により本発明についてより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 : 遺伝子領域の単離

抵抗性遺伝子を有することが知られている 2 倍性ジャガイモ系統 85.37.38 (Watanabe et al. Amer. Potato J. 71: 599-604, 1994) のゲノム DNA から、以下のプライマー設計し、PCR により遺伝子を単離した。なお、プライマーは、既知の植物病虫害抵抗性遺伝子に保存的な領域、例えば NBS や LRR の配列に基づいて設計した。

Forward : 5' -GATCCATTCTATAATGTCTCACT-3' (配列番号 2)

Reverse : 5' -CTATCTATAAGATCTTTAATCA-3' (配列番号 3)

単離された Rmi 遺伝子候補を (Fragment #93) と命名し、その全配列 (配列番号 1) 及び既知の遺伝子との相同性 (表 1) を調べた。

【 0 0 3 4 】

【表 1】

遺伝子	相同性
<i>Solanum acaule</i> NBS-LRR protein	69%
<i>Solanum tuberosum</i> RGC	70%
<i>Solanum tuberosum</i> NBS-LRR prote	69%
<i>Solanum tuberosum</i> Disease d resistance protein Gpa	69%
<i>Solanum tuberosum</i> Rx protein	69%
<i>Capsicum chacoense</i> disease resistance ProteinBS2	54%
<i>Lycopersicon esculentum</i> Prf protein	54%
<i>Lycopersicon esculentum</i> PRF protein	52%
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> Prf proteit	53%
<i>Lycopersicon esculentum</i> tospovirus resistance protein D protein	54%
<i>Arabidopsis thaliana</i> putative protein	96%
<i>Arabidopsis thaliana</i> RPP13 protein	48%
<i>Arabidopsis thaliana</i> rpp8 protein	47%
<i>Oryza sativa</i> Putative disease resistance protein protein	47%
<i>Arabidopsis thaliana</i> viral resistance protein protein	48%
<i>Arabidopsis thaliana</i> disease resistance protein RPM1 isolog	48%
<i>Arabidopsis lyrata</i> NBS/LRR disease resistance protein RPM1 protein	51%
<i>Brassica napus</i> disease resistance gene homolog 9N protein	49%
<i>Oryza sativa</i> RPR1h protein	47%
<i>Oryza sativa</i> RPR1 protein	46%
<i>Brassica napus</i> disease resistance	48%
<i>Triticum aestivum</i> stripe rust resistance protein Yr10 protein	53%
<i>riticum aestivum</i> stripe rust resistance protein Yr10 protein	52%
<i>Oryza sativa</i> Pi-b protein protein	86%
<i>Oryza sativa</i> Pib protein	56%
<i>Fusarium oxysporum</i> protein	50%

【0035】

該バイナリーベクターの境界配列間に外来遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌内で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404、EHA101、EHA105、C58C1Rif^R 等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、これを植物の形質転換体作出用に用

いる。

【0036】

実施例2：ベクターの構築

(1) バイナリーベクターへの挿入

単離されたRmi遺伝子候補(Fragment #93)は、BamHIで切断し、一度p Targetベクターにリゲーションしてから再度BamHIで切り出し、バイナリーベクター：pBE2113Notにリゲーションした。得られた組換えベクターは、E coli DH5 α に導入して増幅し、アグロバクテリウム導入用ベクター (PotatoRKN:pBE2113NotI)を得た。

【0037】

(2) エレクトロポレーション

バイナリーベクター (PotatoRKN:pBE2113NotI) をエレクトロポレーションによって *Agrobacterium tumefaciens* LB4404株 (Gibco BRL) に導入した。すなわち、-80℃で保存されている*Agrobacterium tumefaciens* LB4404株を氷上で解凍し、エッペンベンチ内で1.5 mlエッペンドルフチューブに20 μ l程取り出す。そこに100 ng/ μ lのDNAを1 μ l加えて氷上で静置した後、キュベットに移しエレクトロポレーションを行った。

【0038】

(3) 遺伝子導入の確認

次いで、YM培地を50 μ l加えて吸い上げ、15 mlのファルコンチューブに移し、YM培地をさらに全量で1 mlまで加え、225 rpm、3 時間、30℃で振とう培養した。3 時間後、カナマイシンを含むYM寒天培地上に200 μ lスプレッドし、48～56 時間、30℃で培養し、形成されたコロニーについてPCR、DNA シークエンシングを行い、遺伝子導入を確認した。

【0039】

(4) コロニーPCR

遺伝子導入が確認された*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404株のコロニーを取り出し、表2の組成でコロニーPCRを行った。また、得られたPCR産物を1 μ l取り出し、少量のblue juiceと混合した後、0.5 %TAEに2 %量のアガロースを

溶かしたゲルで泳動した。マーカーは λ HindIII(ボーリンガー・マンハイムのマーカーII)を用いる。その後、表2の割合で混合した溶液を8連チューブに入れ、PCR機 (Gene Amp 9600 : Perkin-Elmer製) にかけた。

【0040】

【表2】

名称	必要量
Buffer	2.50 μ l
MgCl ₂ 150mM	0.5 μ l
dNTP	2 μ l
Primer-Forward(PoMi-F-1、1pmol/	2.5 μ l
Primer-Rivers(PoMi-R-1、1pmol/ μ	2.5 μ l
Taq-porimerase 10 u/ul	0.25 μ l
template	arbitrary
dH ₂ O	+ α
合計	25 μ l

【0041】

上記反応液を1.5 mlのLocking-Tubeに移し、75%イソプロパノール80 μ l加えて混合後、室温で15分放置し、20分遠心(室温・最大スピード)した。上澄みを除き、さらに75%イソプロパノールを250 μ l加えて混合後、5分遠心(室温・最大スピード)し、上澄みを除いてドラフト内で乾燥させた。次に、Template Suppression Reagent (TSR) を25 μ lずつ入れて混合し、スピンドウンして、ヒートブロックで95℃、3分、熱ショックをかけた。これを氷上に放置し、DNA sequencingr310専用のチューブに移し換え、DNA シークエンシングを行った。

【0042】

遺伝子導入が確認されたAgrobacterium tumefaciens LB4404株のコロニーを取り出し、カナマイシン100mg/l入れたYEB培地で30℃、225 rpmで一晩振とう培養する。この培養した菌液をクリオチューブに850 μ lずつ氷上で分注し、グリセリン150 μ lを加え、蓋をしてパラフィルムを巻いた後、ボルテックスを用いて混和した。これを-20℃で冷やしておいた99.5%エタノールにラップに包ん

でつけ、10 分程度-20℃の冷凍庫で冷やす。その後-80℃で冷やしておいた保存ケースに入れて保存した。

【0043】

実施例3：組換え植物の作出

実施例2で作製したベクターを用いてネコブセンチュウ抵抗性遺伝子領域を導入した組換え植物を作出した。宿主植物としては、再分化や成長が早いネコブセンチュウ感受性の2倍体の*Nicotiana benthamiana*（ナス科植物）を用いた。これと平行してネコブセンチュウ感受性の4倍体ジャガイモ品種Desireeにも遺伝子導入を行った。

【0044】

(1) 植物体への*Agrobacterium tumefaciens*の感染

実施例2で作製した*Agrobacterium tumefaciens* LB4404株を氷上で溶かしておく。クリーンベンチ内で50 mlファルコンチューブにYEB培地40 mlを移し、抗生物質を入れて転倒混和し、1チューブあたり10 mlずつ分注し、そこに*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404株10 μ lを加えて、振とう装置で一晩培養し(28℃、225 rpm)、培養液の吸光度を波長600nm分光光度計を用いて測定した。なお、このときの吸光度は約2程度あるのでYEB培地を用いて吸光度が0.6~0.8になるように希釈した。

【0045】

継代後2~3週齢の植物体は、滅菌済み濾紙上でメスを用いて傷つけ、根、茎、葉に切り分けて、乾燥しないように滅菌水につけた。傷をつけた植物断片は吸光度0.6~0.8に調整した*Agrobacterium tumefaciens*溶液に7分間浸し、滅菌済み濾紙上に取り出して十分に水分を切り、共存培地で3日間培養した。なお、共存培地は、ベンジルアデニン(BA) 1mg/l、Trans Zeatin Riboside 35 mg/l、インドール酢酸 0.1mg/lを加えたものを用いた。

【0046】

(2) 共存培地への継代

前項同様共存培地を作製し、これをシャーレに20 mlずつ分注し、滅菌した円形濾紙を載せ、感染させた植物体を移して3日間培養した。

【0047】

【表3】

改変MS培地組成：下記に、シュクロース30g、を加え1lにメスアップし、KOHまたはHClを用いてpH5.9に調整した後、ジェランガム 2.5 gを加えたもの。

Sol No	構成成分	名称	最終濃度	Sol 濃度
Sol 1 (20ml/l)	NH ₄ NO ₃	硝酸アンモニウム	1650mg	82.5g/l
	KNO ₃	硝酸カリウム	1900mg	95.0g/l
	CaCl ₂ 2H ₂ O	塩化カルシウム二水和物	440mg	22.0g/l
Sol 2 (10ml/l)	MgSO ₄ 7H ₂ O	硫酸マグネシウム七水和物	370mg	37.0g/l
	KH ₂ PO ₄	リン酸二水素カリウム	170mg	17.0g/l
Sol 3 (20ml/l)	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物	37.3mg	1.87g/l
	FeSO ₄ 7H ₂ O	硫酸鉄(Ⅱ)七水和物	27.8mg	1.39g/l
Sol 4 (10ml/l)	H ₃ BO ₃	ホウ酸	6.2mg	620mg/l
	MnSO ₄ 4H ₂ O	硫酸マンガン(Ⅱ)四水和物	22.3mg	2230mg/l
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	硫酸亜鉛七水和物	8.6mg	860mg/l
	KI	ヨウ化カリウム	0.83mg	83mg/l
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	モリブデン酸ナトリウム	0.25mg	1ml/l
	CuSO ₄ 5H ₂ O	硫酸銅(Ⅱ)五水和物	0.025mg	1ml/l
	CoCl ₂ 6H ₂ O	塩化コバルト(Ⅱ)六水和物	0.025mg	1ml/l
Sol 5 (10ml/l)	Thiamine-HCl	ビタミンB1塩	0.5mg	50mg/l
	Myo-inositol	イノシトール	0.1mg	10g/l
	Pyridoxin	ビタミンB6	0.5mg	50mg/l
	Nicotinic acid	ニコチン酸	5mg	500mg/l
	Glycine	グリシン	2mg	200mg/l
	Biotin	D-ビオチン	0.05mg	5mg/l
	Folic acid	葉酸	0.5mg	50mg/l

【0048】

(3) カルス形成用培地への継代

表3の改変MS培地にベンジルアデニン 1 mg/l、NAA 0.1 mg/l、カナマイシン 150 mg/l、カルベニシリン 200 mg/lを加えてカルス形成用培地とし、これをシャーレに20 mlずつ分注する。このカルス形成用培地に、共存培地で3日間培養した植物体断片を順次継代した。

【0049】

(4) シュート育成用培地への継代

表3の改変MS培地にカナマイシン 150 mg/l、カルベニシリン 200 mg/lを加えてシュート育成用培地とし、シャーレに20 mlずつ分注する。このシュート育成用培地に、カルス形成用培地で2週間程度培養してカルスが形成された植物体断片を順次継代し、一日中、光（蛍光灯光）のあたる部屋で培養した。

【0050】

(5) MS試験管培地への継代

表3の改変MS培地を1本の試験管に5 mlずつ分注し、オートクレーブで滅菌処理する。これに、シュート育成用培地で再分化させた個体を、完全に独立した個体を1系統として継代した。

【0051】

(6) 発根 (Rooting) 用培地への継代

表3の改変MS培地にカナマイシン 75 mg/l、カルベニシリン 100 mg/lを加えて培養瓶に40 mlずつ分注し、発根用培地とする。MS試験管培地で1~2週間培養し植物体の大きさが2~3 cmに達した固体を、順次この発根用培地へ1瓶3個体程度継代した。

【0052】

(7) 順化

プランターに市販の野菜用の土を入れ、発根用培地で3週間程度培養し、しっかりと根が伸長した個体を移植して育てた。

【0053】

実施例4：サザン・ハイブリダイゼーションによる遺伝子導入の確認

再生個体を選択培地であるカナマイシンを含む培地で育て、発根を主体とした成長の可否を指標として、成長の良好な系統を暫定的に組換え体候補として選抜した。この組換え体候補についてサザン・ハイブリダイゼーションにより遺伝子導入を確認した。

【0054】

(1) 試験方法

この暫定的組換え体候補系統群について、DNAを抽出し、実施例1で使用するプライマー（配列番号2及び3）を用いてPCRを行い、ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子領域を増幅した。

【0055】

PCRにより、遺伝子領域が導入されていると認められた系統について、実施例1で決定されたRmiの配列（配列番号1）をプローブとしてサザンハイブリダイ

ゼーションを行い、導入された遺伝子の数を推定した。ハイブリダイゼーションの条件を表4に示す。

【0056】

【表4】

step	condition	time
Baking	80 °C	2 hours
Prehybridization	55 °C	4 hours
Hybridization	55 °C	17 hours
Primary wash	55 °C	10 min×2
Secondary wash	室温	5 min×2
Expose	暗黒下	3 hours

【0057】

(2)結果

図1の結果をみると、ControlにもPositiveな反応が出ている。これは、非組換え体の植物にもHybridizeする相同な領域を持っているためにPositiveな反応が出たものと思われた。そこでControlとバンドの形態が異なり、Controlよりもバンド数の多い個体を、遺伝子導入された固体と判断した。

【0058】

実施例5：RT-PCRによる遺伝子導入の確認

(1)試験方法

1)cDNAの合成

乳鉢で液体窒素を用いて植物体を粉末状になるまで磨り潰し、常法に従いmRNAを抽出した。このmRNAをもとに、TAKARA RNA PCR Kit（タカラ社製）に添付されたRandom 9mer とM13PrimerM4にdTを付加したプライマーを用いて、表5に示す反応組成で逆転写反応を行い、cDNAを合成した。なお、用いたプライマーと反応条件は以下のとおりである。

【0059】

【表5】

逆転写反応の組成

MgCl ₂	4 ul
10× RNA PCR buffre	2 ul
dNTP Mixture	2 ul
RNase Inhibitor	0.5 ul
Revers Transcriptase	1 ul
Random 9 mers or	1 ul
Oligo dT-Adaptor Primer	
Template(mRNA)	9.5 ul
計	20 ul

<Random 9 mers Primerを用いた反応>

Random 9mer: dp(5'-NNNNNNNNN-3')

反応条件: 30 °C 10 min プレインキュベート

42°C 30分、99°C 5分、55°C 5分、1サイクル

<Oligo dT-Adaptor Primerを用いた反応>

Oligo dT Adaptor: M13PrimerM4: 5'-gttaccgagtcacgac-3' (配列番号4) に Oligo-dT を付加したもの。

反応条件: 42°C 30分、99°C 5分、55°C 5分、1サイクル

【0060】

2) PCR反応

次に、得られたcDNAを用いてPCRを行った。PCR反応は、GeneAmp 9600 (Applied Biosystems製) を用いて、以下に示すプライマー (Primer:RKNとPrimer: Start2×2、Primer:PotaLRR) および反応条件で行った。

<Primer:RKNを用いたPCR反応>

Primer RKN-F1: GTTGGTCATGAAAATGAA (配列番号5)

Primer RKN-R1: ATATTGCTCTTCCAATCA (配列番号6)

【0061】

【表6】

Primer:RKNを用いたPCR反応組成

名称	必要量
10x Buffer	5 μ l
MgCl ₂ 150mM	1 μ l
dNTP 2mM	4 μ l
Primer-Forward(RKN-F1、1pmol/ μ l)	5 μ l
Primer-Rivers(RKN-R1、1pmol/ μ l)	5 μ l
Taq-polymerase 10u / ul	0.5 μ l
template	275 ng
dH ₂ O	+ α
合計	50 μ l

反応条件：95°C 10分、95°C 1分、55°C 2分、72°C 3分 30サイクル
最終伸張72°C10分

<Primer: Start2×2、PotaLRRを用いた反応>

Primer Start2X2: ATGGCTTATGCTGCTATTACTTGT (配列番号7)

Primer PotaLRR: CTAAGTGATACAGACCTCAACAGA (配列番号8)

【0062】

【表7】

Primer: Start2×2、PotaLRRを用いたPCR反応組成

名称	必要量
Buffer	5 μ l
MgCl ₂	1 μ l
dNTP	4 μ l
Primer-Forward(Start2×2-F、1pmol/ μ l)	5 μ l
Primer-Rivers(PotaLRR-1、1pmol/ μ l)	5 μ l
Taq-polymerase	0.5 μ l
template	275 ng
dH ₂ O	+ α
合計	50 μ l

反応条件：95°C 10分、95°C 1分、55°C 2分、72°C 3分 30サイクル
最終伸張72°C10分

【0063】

3) 電気泳動

上記で得られたPCR産物を電気泳動し、そのバンドの違いを比較することによ

って遺伝子導入の有無を判断した。

【0064】

(2) 結果

RT-PCRの結果を図2に示す。13より、Primer:RKNとPrimer: Start2×2、Potal RRにおいて、Controlにはバンドは検出されず、組換え体候補（個体8及び9）にはバンドが検出された。これより、組換え体における遺伝子導入と転写が確認された。

【0065】

実施例6：組換え植物の抵抗性評価

(1) 試験方法

遺伝子導入が確認された*Nicotiana benthamiana*組換え体（No.8, No.18）、*Nicotiana benthamiana*の非組換え体、及びネコブセンチュウ感受性であるトマト系統TA209にネコブセンチュウ（*Meloidogyne incognita*）を感染させた。そして、その後の植物体地上部や根の様子を肉眼、及び顕微鏡で観察した。

【0066】

また、遺伝子導入が確認された*Nicotiana benthamiana*組換え体（No.1, No.8, No.14）、非組換え体、及びTA209を、ネコブセンチュウ（*Meloidogyne incognita*）感染土壌で栽培して、抵抗性を評価した。同様に栽培して評価した。評価は、常法（Williamson et al. Plant Cell, 1998）に従い、Erioglaucine（Sigma-Aldrich）を用いてネコブセンチュウの卵を染色し、卵の有無や数を測定し、これにより抵抗性を評価した。また、この際に、根中の成虫の存在についても確認を行った。こうして、遺伝子導入数とセンチュウ抵抗性の関係を調べた。

【0067】

(2) 結果

組換え体の地上部の状態は、非組換え体及びTA209の地上部の状態と比べて黄化の程度が進んでおらず、根瘤数も少なかった。さらに根を顕微鏡で観察したところ、組換え体では根に瘤状の変形は見られなかったが、非組換え及びTA209では根に瘤状の変形が見られ、その中にセンチュウの卵と思われる影を観察することができた。以上より、本発明の遺伝子を導入した組換え植物は、高いネコブセ

ンチュウ抵抗性を有することが確認された。

【0068】

さらに、本発明の組換え植物は、33～35℃という高い温度条件下で培養・栽培してもネコブセンチュウに対する抵抗性維持し続けることができた。したがって、本発明の遺伝子はMi遺伝子のような高温感受性（28℃で失活）がないことが確認された。

【0069】

実施例7：タバコ野生種におけるネコブセンチュウ抵抗性評価

(1) 試験方法

実施例2で作製したベクターを用いて、実施例3の方法にしたがい、タバコ野生種にネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を導入した。遺伝子導入したそれぞれの系統について、サザンハイブリダイゼーション及びRT-PCRによって遺伝子導入を確認した。さらに、組換え植物をネコブセンチュウ（Root-knot nematodes）感染土壌に植え、温室内において、昼間は30-35℃、夜間は25-30℃で6週間育て、その抵抗性を根瘤や顕微鏡観察により評価した。評価基準を以下にその結果を表6に示す。

HR：根瘤、卵いずれもナシ

R：根瘤ナシ、いくらかの卵が根に認められる

MR：いくらかの根瘤、及び卵が根に認められる

MS：多数の根瘤が根に認められる

S：多数の根瘤が根全体に認められる

【0070】

(2) 結果

表6より明らかなように、本発明のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子はトマトのmi遺伝子等の従来のネコブセンチュウ抵抗性遺伝子にはない、量的抵抗性を有することが確認された。

【0071】

【表 8】

系統	Southern	RT-PCR *	抵抗性**
	挿入遺伝子数		
N. benthamiana	control	N	S
IK-1	I	N	S
IK-2	I	N	S
IK-3	I	P	MR
IK-4	3	P	HR
IK-6	2	P	R
IK-7	0	--	S
IK-11	1	P	MR
IK-12	1	P	MR
IK-14	2	P	R
IK-15	3	P	HR
IK-16	0	--	MS
IK-17	0	--	S
IK-18	0	--	MS
IK-19	0	--	S
IK-20	0	--	S
IK-24	1		MS

* N : Negative, P:Positive -- : 評価

【0072】

【発明の効果】

本発明により、高温感受性がなく、様々なネコブセンチュウの種や系統に幅広く対応できる、量的抵抗性を有する新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を提供される。該遺伝子を利用すれば、ジャガイモ、トマト、タバコ等の重要な作物に、高いネコブセンチュウ抵抗性を付与することができる。

【0073】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> President of University of Tsukuba

<120> A New Root-knot Nematodes Resistance Gene and Its Use

<130> P01-0960

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2613

<212> DNA

<213> Solanum tuberosum

<400> 1

atggcttatg ctgctattac tctctttatg agaaccatac aacaatctat tcaacttact 60
ggatgtaatt tgcaatgatgaaaag tttgaatctt tgagagcttn tttggagaaa 120
cacacgggca atcttgatgc attgaaaagc ttggaagctg aaatcataga acttgatgc 180
actacagaag atattttgga cttggaatca agaatgtta aaaatccaat ttcaagaata 240
atagcttttt ggaaacttca ttctctcttg aaacaagcag taggacgcat tgattccacg 300
ctgaacaagt ggatggaaat gcagaacatg tacaccaaaa ggaaagatga agaagcacat 360
aacttggatc ttgctagtac tgcatcaatg tctcaacatg ttgtggagcc tcaggatatg 420
atggttggac atgaaaatga actcgagatg atcatgcagg atcagcttgc tagaggagca 480
agtgaacttg aagttgtctc cattgtaggt atggggggca tcggtaaagac aactttggct 540
gacaaaattt ataatgatcc attcataatg tcacactttg acattcgtgc aaaagctact 600
gtttcacaag agtattgctc gaaaaatgta tgcctaagtc ttctttcttc tataagtga 660
aagagcaatg agcatcaaga tgatgggcaa ctagctgatc gactgcaaaa aagtctaaaa 720
gggaggaggt atttagtagt cattgatgac atatggaccg aacgagcttg ggatgatatg 780
aaactatgtt tcccagattg taactgtgga agcagaatac tgctgacaac tcggaatatg 840
gaagtagcta agtatgctag ctcaggtaag cctcctaaga atcaaatgcg actcttgaat 900
attgatgaaa gtggaagtt actaccagc agagtctttg taaaaaactg tttctcccct 960

gaatttgaac aacttgggaa acaaattgct cttaaattgct ggggattacc ttagctatt 1020
 atcgttattg ctggagtict gtctaattatt ggtgagtcatt ttgatgaatg gacaagtgtt 1080
 gcagagaatg taagttcagt ggtaagtaca gatcacaatg tacaatgcat gagagtgttg 1140
 gcgttgagtt atcatcactt accacatcac ttgagagcgt gttttctata ttttgcaata 1200
 ttcccgagg atacagtgat ttttgtgaat aaacttgtga aattatggac agcagagggt 1260
 ttttgaaga cagaaatgat gaaaagtata gaagaagttg cagaaaaatg tgtaaagat 1320
 cttatagata gaaatttagt tttgtccaa aggggtgagta gttttgatgg aaaaataaaa 1380
 gcttgtggaa tgcatgatgt gatccgtgaa ctctgcttga gagaagctcg aaacncaa 1440
 ttttgtaatg ttataatgga taatcaaaat ccatgtgaac aatccatgaa ttattccaca 1500
 aaggaggttc ggataagtat ccaatccaaa ctgtctgcca atcagttgtc tatggtttgt 1560
 aataacgatt cctattctgt tctcgttttt actgaagatc cctcaagctc aagaatgggt 1620
 cagggttga agcatttcaa ggtactaaga gtacttatct tgcttcggtg gcattgcatg 1680
 tttcccaatt gcatagtga actatttcac ttgagatata taggtttgag tgtttactcg 1740
 gactaatg attgggatat ttgttttcca tctcaatag ctagccttga gtatttgc 1800
 ttaataac ttaagtttcc aacatctctc ggatggaagt ttagtagact ttcagatta 1860
 ccatcgagta tttcaagat gtcgcaattg aggcattctat ctttgactg gaattacttg 1920
 aatggacatg aatctagcga gagatcaagt tgggttttga gaaatcttga gtgtctgtct 1980
 ggatggaatc ctttatcttg tacttcttcg gtttttagac tacttccgaa tgtaaagaag 2040
 ttgcaaata gtggtatcca agaagactac ataagaaagg acaaggctt tgatgatctt 2100
 tgctgcttaa atcagcttac agaattgaaa ttaagatta gaaagatgat tggaagagca 2160
 atatatgata catcttttgt tcttctctc ctagggtgctt ttccgaagaa ccttaagaag 2220
 ttagctttta cagggtactcg tttgcattgg aaggatttgg agattcttgg taagttgcct 2280
 aaactcgagg ccctcaaact aggatatgat gcctgcattg gtactgattg ggaagtaggt 2340
 gaggaagggt ttccacactt gaagttcttg cgattgaagc attgtactt gcataactgg 2400
 agagctagta gtgatcattt tccacgactt gaacgactag tcattaaccg tcgttgagc 2460
 atgtattcga tcccacagga tttgttagac ataaccacac ttcagctgat tcatataann 2520
 gactctgcaa aatctgttgg gaactccgcc aagaagattc agcaggaaat tgaagacagc 2580
 tatggaagtt ctgttgaggt ctgtatcagt tag 2613

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

gatccattct ataatgtctc act

23

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

ctatctataa gatctttaat ca

22

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 4

gttttcccag tcacgac

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 5

gttggtcatg aaaatgaa

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

atattgctct tccaatca

18

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 7

atggcttatg ctgctattac ttgt

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

ctaactgata cagacctcaa caga

24

【 0 0 7 4 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 2 ～ 8 : プライマー

【図面の簡単な説明】

【図1】

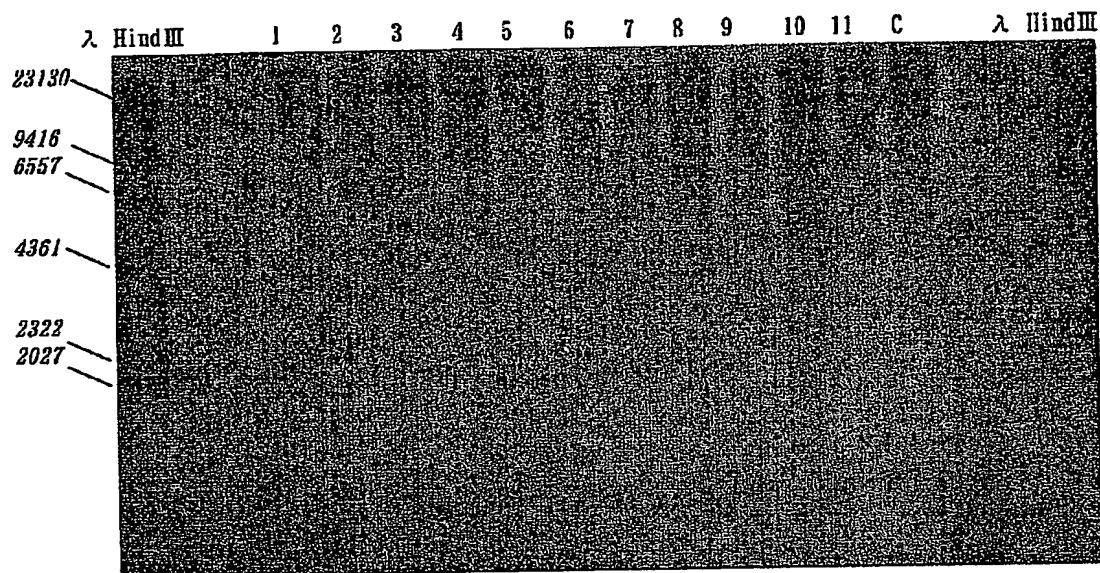
図 1 は、サザン・ハイブリダイゼーションによる遺伝子導入の確認結果を示す。

【図2】

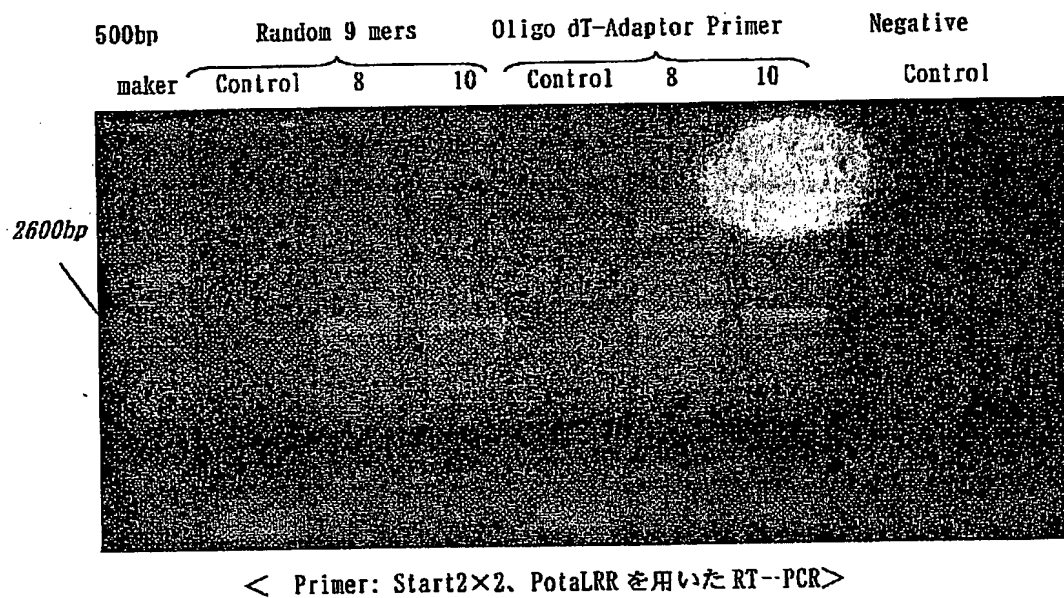
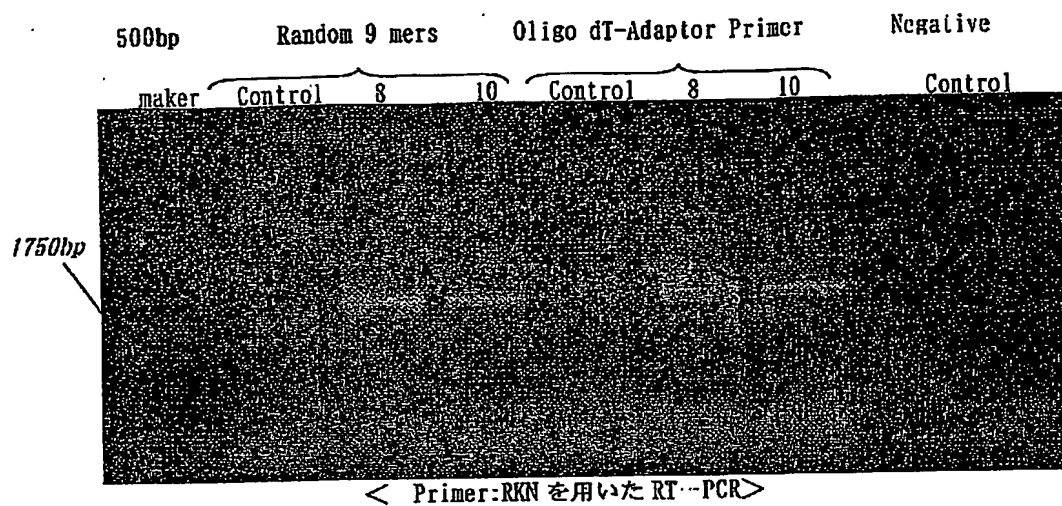
図 2 は、RT-PCR法による遺伝子導入の結果を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れたネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を見出し、ネコブセンチュウ被害に対する解決策を提供すること。

【解決手段】 2倍性ジャガイモ系統より、高温感受性がなく、幅広い種や系統のネコブセンチュウに対応可能な、量的抵抗性を有する新規ネコブセンチュウ抵抗性遺伝子を単離する。さらに、該遺伝子を導入したネコブセンチュウ抵抗性組換え植物を作出する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-089622
受付番号	50200437172
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成 14 年 4 月 26 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391012361
【住所又は居所】	茨城県つくば市天王台1丁目1番地の1
【氏名又は名称】	筑波大学長

【代理人】

【識別番号】	100091096
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森 ビル3階平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	平木 祐輔

【代理人】

【識別番号】	100118773
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森 ビル3階 平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	藤田 節

【代理人】

【識別番号】	100119183
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森 ビル3階 平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	松任谷 優子

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[391012361]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県つくば市天王台1丁目1番地の1

氏 名 筑波大学長